

C₃、C₄ 和 CAM 植物的光呼吸 及有关酶活性的比较研究

彭飞燕 陈升枢 李明启
(农业生物系)

摘要 对 4 种 C₃ 植物和 4 种 C₄ 植物, 6 种 CAM 植物的光呼吸的研究表明: C₄ 和 CAM 植物象 C₃ 植物一样表现出断光后 CO₂ 的猝发; 它们的乙醇酸氧化酶活性远低于 C₃ 植物, 而过氧化氢酶活性略低于 C₃ 植物; 光下有乙醇酸的合成。我们认为在 C₄ 和 CAM 植物中也存在光呼吸乙醇酸循环。C₄ 植物表观光呼吸的大小可能与其叶的解剖特征有关, 而 CAM 植物的表观光呼吸可能与其代谢的昼夜节律变化有关。我们还研究了 CAM 植物的乙醇酸循环在早晨和傍晚的变化规律, 发现绝大多数 CAM 植物的乙醇酸氧化酶活性、过氧化氢酶活性和乙醇酸的合成量都一致表现为傍晚高于早晨。我们认为 CAM 植物体内乙醇酸循环的运转傍晚较早晨快。

关键词 光呼吸; 乙醇酸氧化酶; 景天酸代谢

C₄ 植物是否存在光呼吸, 至今尚无统一的看法。一些研究者认为在 C₄ 植物中同样存在光呼吸^[10]。他们的依据是: C₄ 植物具有光呼吸细胞器, 且含有与光呼吸有关的酶^[9]; C₄ 植物的乙醇酸库随氧浓度的升高而增大^[14]; 同位素示踪试验结果表明, C₄ 植物叶中的甘氨酸和丝氨酸是通过光合氧化作用合成的^[20]。然而却仍有一些现象是难以解释的。例如, 在某些 C₄ 植物中测不到断光后 CO₂ 猝发 (PICB)^[5]; C₄ 植物的光合速率不受氧分压的影响^[19]。他们指出由于 C₄ 植物的 RuBP 羧化酶和与乙醇酸代谢有关的酶类主要存在于维管束鞘细胞中^[3], 而维管束鞘细胞内 CO₂ 的浓度很高, 因而光呼吸在那里不可能发生^[8]。关于 CAM 植物光呼吸的研究, 至今只有为数不多的报道。Crews 等 (1975) 在菠萝中测得两个 PICB 峰, 其中前一个猝发峰对 O₂ 和 CO₂ 敏感, 他们认为这个猝发峰来自光呼吸^[7]。一个相反的观点认为: 在光下 CAM 植物气孔关闭, 由于苹果酸脱羧使细胞内 CO₂ 浓度升高, 抑制了 RuBP 加氧酶活性^[12]。目前对 CAM 植物是否有光呼吸亦尚未有一致的意见。本试验试图通过测定断光后 CO₂ 的猝发, 光呼吸酶系统中的两个重要酶 (乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶) 活性和光呼吸底物——乙醇酸的合成量, 对 C₃、C₄ 和 CAM 植物的光呼吸进行比较。

1 材料和方法

1.1 材料

C₃ 植物: 烟草 (*Nicotiana tabacum* L.), 小白菜 (*Brassica chinensis* L.), 菜心 (*Brassica parachinensis* Bailey), 向日葵 (*Helianthus annuus* L.)

C₄ 植物: 玉米 (*Zea mays* L.), 甘蔗 (*Saccharum officinarum* Roxb.), 高粱 (*Sorghum vulgare* Pers.), 苋菜 (*Amaranthus tricolor* L.)。

1990-05-02 收稿

CAM 植物: 鸡爪三七 (*Kalanchoe laciniata* (L.) DC.), 落地生根 (*Bryophyllum pinnatum* (L.) Oken), 剑麻 (*Agave sisalana* Perrine), 洋吊钟 (*Kalanchoe verticillata* Elliot), 虎尾兰 (*Sansevieria trifasciata* Prain), 金边虎尾兰 (*Sansevieria trifasciata* var *laurentii* N. E. Brown)

各种植物材料均采用土培盆栽。C₃ 和 C₄ 植物每日淋水一次, CAM 植物每隔两天淋水一次。各种材料每周施复合肥 (N:P:K=9:15:15) 一次, 每次用量约 2~3 g/盆。植物生长在冬季自然光照条件下。日平均气温 15~20℃, 平均日照时数 9~11 h。在花前生长期取样测定。取样前植物在自然光照下照光 2 h 以上, 选取植株上层第 3, 4 轮叶片进行测定。此外, CAM 植物分别在上午 8:00 (日出后 1~1.5 h) 和傍晚 17:00 (日落前 1.5~2 h) 取样测定。

1.2 方法

断光后 CO₂ 的猝发 (PICB)、光合速率、暗呼吸强度的测定: 用 BIN4, 2 型红外线 CO₂ 分析仪测定。照光强度为 620 w·m⁻², 采用半开放式测定法测定, 以大气为背景气, 气体流速为 50 L/h, 叶室温度控制在 30±2℃。

酶活性测定: 酶液提取和乙醇酸氧化酶活性测定参照汤小仪, 欧阳光察^[1]的方法。过氧化氢酶活性测定采用 Luck^[13]方法。蛋白质含量测定采用 Bradford^[4]的考马斯亮兰比色法。

乙醇酸合成量的测定: 乙醇酸的提取和分离分别依 Zelitch^[21,22]方法。乙醇酸合成量的测定用变色酸法^[15]。

可滴定酸含量的测定: 参照 Chen 和 Black^[4]方法。

以上各项指标的测定各材料均重复 4 次。

2 试验结果

2.1 CAM 植物可滴定酸含量的昼夜变动

在测定其它项目之前, 分别在早晨 8:00 和傍晚 17:00 取样, 测定 CAM 植物可滴定酸含量。测定结果见表 1。选用的所有 CAM 植物都表现为早晨酸度高, 傍晚低。表明这些植物在夜间有明显的苹果酸积累, 而在白天苹果酸逐渐消耗, 符合 CAM 植物的特征。

表 1 CAM 植物早晚可滴定酸含量的变动

材 料	可滴定酸含量*		差 值
	(meq·100 g ⁻¹ fr. wt.)		
	8:00 取样	17:00 取样	
落地生根	35.38±0.12	1.68±0.005	33.70
鸡爪三七	21.75±0.08	0.78±0.010	20.97
剑 麻	16.05±0.03	1.55±0.021	14.50
洋 吊 钟	12.85±0.05	0.65±0.002	12.20
金边虎尾兰	8.85±0.02	3.55±0.015	5.30
虎 尾 兰	8.23±0.06	4.48±0.050	3.75

* 4 个重复平均值±标准差

2.2 乙醇酸循环有关的酶活性及乙醇酸合成量

测定结果见表2和表3。所有供试的C₃、C₄和CAM植物都具有乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶活性,并且在光下有乙醇酸的合成,其中C₃植物的乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶比活性为最高,C₄植物和傍晚时的CAM植物的乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶的比活性比较接近。植物种间的乙醇酸合成量存在很大差异。其原因之一是由于我们以鲜重为单位,而不同植物其叶内水分含量可能不同。例如,CAM植物的含水量为5.1~14.9 g水/dm²叶面积,非CAM植物一般在0.1~1.2 g水/dm²叶面积^[11]。在CAM植物中,除虎尾兰外,其余都表现出乙醇酸氧化酶、过氧化氢酶比活性和乙醇酸合成量傍晚高于早晨。

表2 C₃和C₄植物乙醇酸氧化酶、过氧化氢酶活性和乙醇酸合成量*

代谢类型	植物材料	乙醇酸氧化酶活性 (U · mg ⁻¹ protein · min ⁻¹)	过氧化氢酶活性 (m mol · mg ⁻¹ protein · min ⁻¹)	乙醇酸含量 (μ mol · g ⁻¹ fr. wt.)
C ₃ 植物	烟草	0.2038 ± 0.0234	21.58 ± 0.78	0.65 ± 0.029
	向日葵	0.1505 ± 0.0204	10.42 ± 0.26	1.02 ± 0.051
	小白菜	0.3946 ± 0.0247	39.43 ± 2.10	0.29 ± 0.029
	菜心	0.1775 ± 0.0106	35.41 ± 1.02	0.49 ± 0.031
C ₄ 植物	玉米	0.05393 ± 0.00366	8.103 ± 0.141	1.56 ± 0.086
	苋菜	0.05188 ± 0.00216	9.974 ± 0.122	0.56 ± 0.033
	甘蔗	0.04239 ± 0.00211	12.510 ± 0.260	0.45 ± 0.020
	高粱	0.01604 ± 0.00024	8.826 ± 0.304	2.62 ± 0.062

*4个重复平均值±标准差

表3 CAM植物乙醇酸氧化酶、过氧化氢酶活性和乙醇酸合成量*

植物材料	乙醇酸氧化酶活性 (U · mg ⁻¹ Protein · min ⁻¹)		过氧化氢酶活性 (m mol · mg ⁻¹ Protein · min ⁻¹)		乙醇酸合成量 (μ mol · g ⁻¹ fr · wt)	
	取样时间		取样时间		取样时间	
	8:00	17:00	8:00	17:00	8:00	17:00
落地生根	(8.338 ± 0.431) × 10 ⁻³	(23.34 ± 2.58) × 10 ⁻³	2.419 ± 0.065	11.72 ± 0.068	0.053 ± 0.0014	0.082 ± 0.0005
鸡爪三七	(8.732 ± 0.612) × 10 ⁻³	(18.00 ± 0.77) × 10 ⁻³	1.185 ± 0.035	7.317 ± 0.078	0.049 ± 0.0007	0.16 ± 0.010
剑麻	(5.308 ± 0.617) × 10 ⁻³	(13.56 ± 0.92) × 10 ⁻³	1.686 ± 0.083	8.597 ± 0.091	0.093 ± 0.0040	0.10 ± 0.002
洋吊钟	(6.396 ± 0.772) × 10 ⁻³	(27.34 ± 2.17) × 10 ⁻³	1.337 ± 0.056	2.767 ± 0.077	0.052 ± 0.0017	0.17 ± 0.006
金边虎尾兰	(1.205 ± 0.008) × 10 ⁻³	(10.00 ± 0.98) × 10 ⁻³	2.974 ± 0.068	7.503 ± 0.021	0.058 ± 0.0012	0.075 ± 0.0004
虎尾兰	(7.140 ± 0.291) × 10 ⁻³	(3.302 ± 0.18) × 10 ⁻³	1.487 ± 0.013	8.644 ± 0.009	0.093 ± 0.0007	0.085 ± 0.0003

*4个重复平均值±标准差

2.3 光合速率、断光后 CO₂ 的猝发和暗呼吸强度

在测定 3 类植物内在的与光呼吸有关的酶活性和底物合成量的同时, 我们直接测定了这 3 类植物的光合速率、表观光呼吸和暗呼吸强度。测定结果见表 4 和图 1, 2。从测定结果看, 几种 C₄ 植物的 PICB 明显小于 C₃ 植物, 而光合速率却明显大于 C₃ 植物; 暗呼吸强度比较接近。甘蔗的 CO₂ 猝发峰表现出有两种类型: 一种是单峰型; 另一种是双峰型。我们分别在早晨 (8:00~9:00) 和傍晚 (16:00~17:00) 测定 CAM 植物的光合速率、PICB 和暗呼吸强度。从测定结果 (图 2) 看, 各种 CAM 植物的 PICB 图形表现不一, 所有供试的 CAM 植物在两个测定时间里都表现出断光后有一个 CO₂ 猝发峰存在, 但这个猝发峰的大小不稳定。在光照下多数的 CAM 植物表现为无 CO₂ 交换。

表 4 C₃ 和 C₄ 植物光合速率、PICB 和暗呼吸强度

代谢类型	植物材料	光合速率	断光后 CO ₂ 猝发	暗呼吸强度
		(mg CO ₂ · dm ⁻² · h ⁻¹)		
C ₃ 植物	烟草	7.74±0.15	1.72±0.02	0.81±0.05
	向日葵	15.07±0.08	1.59±0.07	2.84±0.42
	小白菜	10.13±0.20	1.54±0.12	1.82±0.05
	菜心	14.76±0.40	1.00±0.04	2.00±0.06
C ₄ 植物	玉米	18.17±0.44	0.21±0.01	2.48±0.04
	苋菜	19.78±0.34	0.32±0.01	2.19±0.11
	甘蔗	15.86±0.57	0.83±0.02	1.76±0.07
	高粱	18.52±0.42	0.25±0.01	1.20±0.03

* 4 个重复平均值±标准差

3 讨论

Ohnishi 等^[16]指出, C₄ 植物叶肉细胞和维管束鞘细胞的过氧化物酶体都属于叶型过氧化物酶体, 即它们都具有进行乙醇酸代谢的能力。从本试验的结果来看, 供试的 4 种 C₄ 植物均表现出具有乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶活性, 且光下有乙醇酸的合成, 这意味着这些植物在光下叶片内存在着乙醇酸循环, 虽然与 C₃ 植物相比, C₄ 植物的乙醇酸循环强度远为低。

PICB 的测定结果 (图 1) 表明, 受测的 4 种 C₄ 植物在断光后都有一个二氧化碳猝发峰, 虽然这个猝发峰比 C₃ 植物要小得多。根据我们的试验结果并结合前人的研究, 我们认为在 C₄ 植物中存在内在的光呼吸, 其表观光呼吸的表现与其叶解剖结构有着密切联系。因为 C₄ 植物的光合作用在叶肉细胞和维管束鞘细胞两类细胞中进行, 使其光合碳代谢在细胞间区域化。叶肉细胞主要进行大气 CO₂ 的固定, 形成 C₄ 酸, 维管束鞘细胞进行 C₄ 酸的脱羧和碳还原循环, 由于脱羧而产生的高浓度 CO₂ 促进了 RuBP 羧化酶活性而抑制了它的加氧酶活性。同时, 维管束鞘细胞内 CO₂ 的释放需穿过数层叶肉细胞, 故由光呼吸产生的 CO₂ 被再固定的可能性很大。因而, C₄ 植物具有较高的光合速率和较低的光呼吸强度。

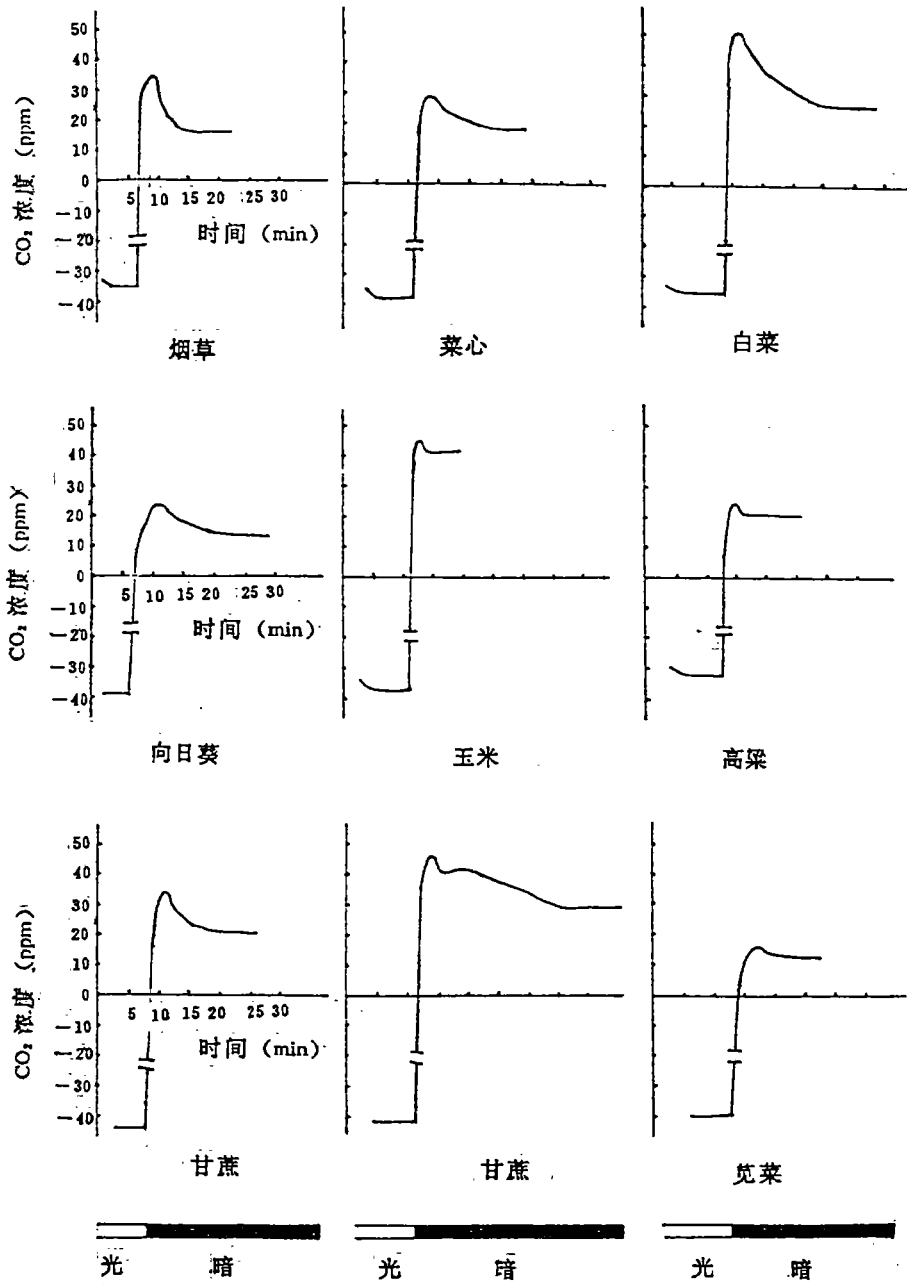


图1 C₃、C₄植物断光后CO₂的猝发

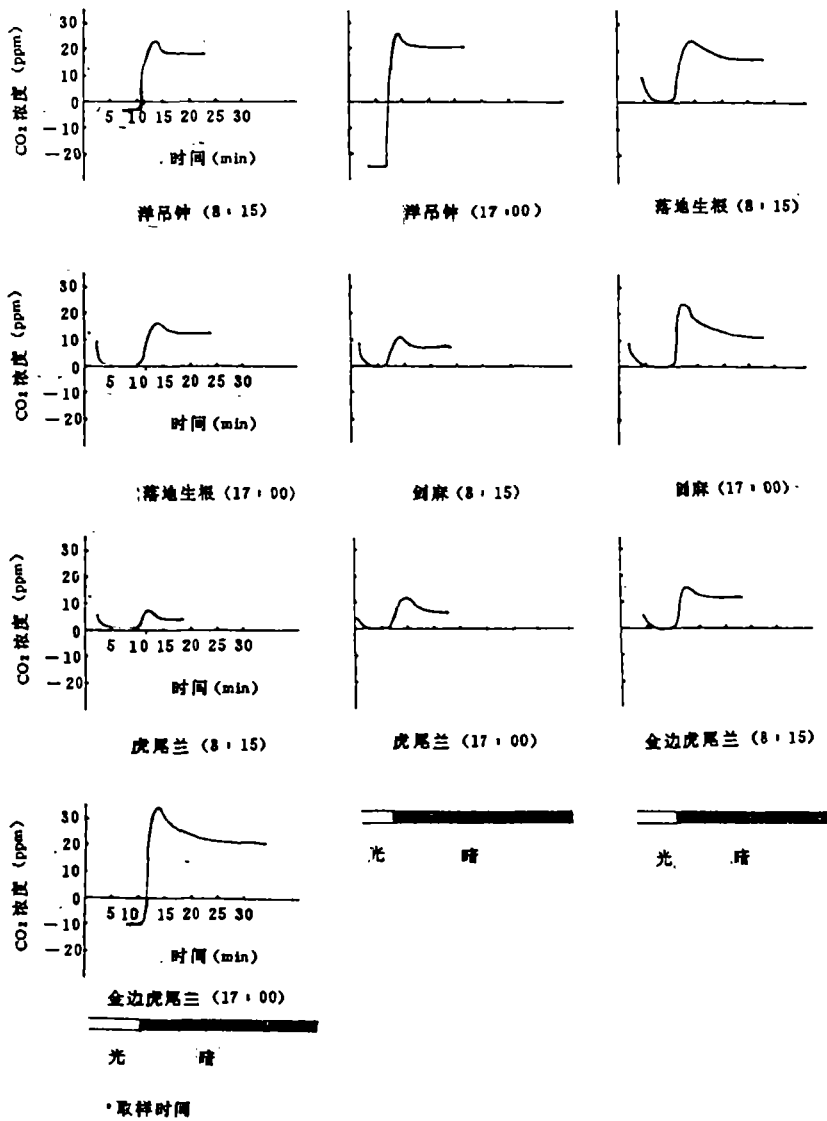


图2 CAM植物断光后二氧化碳的猝发

到目前为止,关于CAM植物乙醇酸循环有关酶类的活性及乙醇酸合成量的昼夜变化仅有 Osmond^[17]的以及 Pandey 和 Sanwal^[18]以 *Nopalea dejecta* 为材料所做的研究。然而我们的测定结果与 Pandey 和 Sanwal 的结果不完全一致。其中一致的是乙醇酸合成量的变化多数表现为晚高早低;不一致的是,他们测得乙醇酸氧化酶和过氧化氢酶活性都表现为早高晚低,与我们的结果恰好相反。我们认为,在上午脱羧期,由于C₄酸脱羧使细胞内CO₂浓度升高,抑制了RuBP加氧酶活性,因而,由其催化生成的乙醇酸量较低,乙醇酸氧化酶活性和过氧化氢酶活性也较低。在傍晚时,细胞内苹果酸含量降到最低点,CO₂浓度很低,使RuBP加氧酶活性增强,乙醇酸生成量增加,乙醇酸促进了乙醇酸氧化酶活性^[2],过氧化氢酶活性也增高。

本试验对6种CAM植物分别在早晨(8:00)和傍晚(17:00)测定其PICB。结果,在早晨和傍晚它们都表现出断光后CO₂的猝发。由于傍晚时,植物组织内的CO₂浓度较低,RuBP加氧酶活性增强,因而此时PICB中的CO₂可能来自光呼吸;在早晨,由于苹果酸的脱羧,使细胞内CO₂浓度升高,不利于RuBP加氧反应的进行,故此时PICB中的CO₂可能小部分来自光呼吸,而大部分则来自脱羧反应。

参 考 文 献

- 1 汤小仪,欧阳光察.乙醇酸氧化酶活性的测定.上海植物生理学会编.植物生理学实验手册.上海:科学技术出版社,1985.195~197
- 2 黄卓烈,李明启.光对水稻(*Oryza sativa*)幼苗乙醇酸氧化酶活性的影响.植物生理学报,1985,11(1):25~32
- 3 Baldy P, et al. Compartmentation of photorespiratory enzymes in a C₄ photosynthesis plant. *Zeamays*. *Z Pflanzenphysiol*, 1984, 114 (3): 255~259
- 4 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254
- 5 Brown R H and Gracen V E. Distribution of the postillumination CO₂ burst among grasses. *Crop Sci*. 1972, 12: 30~33
- 6 Chen Sheng-Shu and C C Black Jr. Diurnal changes in volume and specific tissue weight of Crassulacean acid metabolism plants. *plant Physiol*, 1983, 71: 373~378
- 7 Crews C E, et al. Postillumination burst of carbon dioxide in Crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol*, 1975, 55: 652~657
- 8 Danks S M, et al. Photosynthetic systems: structure, function and assembly. John Wiley and Sons, Chichester, UK. 1983. 91~92
- 9 Edwards G and D Walker. Photorespiration. In: C₃, C₄; Mechanisms and cellular and environmental regulation of photosynthesis (Edwards G and D Walker, eds.), Blackwell Scientific Publications, 1983. 368~444
- 10 Ikeda M. Photosynthetic carbon metabolism in corn leaves treated with methionine sulfoximine and ammonium. *Soil Sci. Plant Nutr*, 1985, 31 (3): 469~474
- 11 Kluge M and I P Ting. Crassulacean acid metabolism. Springer-Verlag, Berlin. 1978. 97~98
- 12 Lorimer G H and T J Andrews. The C₂ chemo- and photorespiratory carbon oxidation cycle. In: The biochemistry of plants, (Hatch M D and N K Boardman, eds.), Vol. 8, Photosynthesis, Academic Press, New York. 1981. 330~375
- 13 Luck H. Catalase. In: Methods of enzymatic analysis, (Bergmeyer H U, ed), Academic Press, London. 1963.

- 885~894
- 14 Marek L F and Stewart C K. Photorespiratory glycine metabolism in corn leaf discs. *Plant Physiol.* 1983, 73, 118~120
 - 15 Niederwieser A, et al. Glycolic acid in urine. A colorimetric method with primary hyperoxaluria. *Clinica Chemica Acta* 1978, 89: 19~23
 - 16 Ohnishi J, et al. Differentiation of photorespiratory activity between mesophyll and bundle sheath cells of C_4 plants. I. Peroxisomes of *Panicum miliaceum* L. *Plant Cell Physiol.* 1985, 26 (5): 797~803
 - 17 Osmond C B, CO_2 assimilation and dissimilation in the light and dark in CAM plants. In: CO_2 metabolism and plant productivity, (Burriss R H and C C Black, eds.), University Park Press, Baltimore. 1976, 217~233
 - 18 Pandey O P and Sanwal G G. Diurnal variation of some glycolate pathway enzymes in *Nopalea dejecta*; a CAM plant. *Indian J. Plant Physiol.* 1984, 27 (4): 334~339
 - 19 Peterson R B. Quantitation of the oxygen — dependent, carbon dioxide — reversible component of the postillumination carbon dioxide exchange transient in tobacco and maize leaves. *Plant Physiol.* 1987, 84: 862~867
 - 20 Tournier P J and Gerster R. Incorporation of oxygen into glycolate, glycine, and serine during photorespiration in maize leaves. *Plant Physiol.* 1984, 74: 108~111.
 - 21 Zelitch I. The photooxidation of glyoxylate by envelope — free spinach chloroplasts and its relation to photorespiration. *Arch Biochem Biophys.* 1972, 150: 698~707
 - 22 Zelitch I. Alternate pathways of glycolate synthesis in tobacco and maize leaves in relation to rates of photorespiration. *Plant Physiol.* 1973, 51: 299~305

COMPARATIVE STUDIES ON PHOTORESPIRATION AND THE ACTIVITIES OF PHOTORESPIRATION ENZYMES IN C_3 , C_4 AND CAM PLANTS

Peng Feiyan Chen Shengshu Li Minqi

(Department of Agricultural Biology)

Abstract Studies on the photorespiration of four typical C_3 and C_4 plants and six CAM plants showed that C_4 and CAM plants showed postillumination CO_2 burst (PICB) as did C_3 plants. The activity of glycolate oxidase in C_4 and CAM plants compared to that in the C_3 plants was much lower and the activity of catalase slightly lower. Glycolate formation also existed in C_4 and CAM plants. It was considered that there was a glycolate cycle in C_4 and CAM plants. The rate of photorespiration in C_4 plants may be related to their anatomical features, and as to CAM plants it may be related to the diurnal rhythm of its metabolism. The variation of glycolate cycle in the morning and dusk in CAM plants was studied. It was found that most of the CAM plants showed higher activities both of glycolate oxidase and catalase and a larger quantity of glycolate formation at dusk than in the morning. The turnover of the glycolate cycle was postulated to be faster at nightfall than in the morning in CAM plants.

Key words Photorespiration; Glycolate oxidase; Crassulacean acid metabolism